

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(FILE 'HOME' ENTERED AT 14:53:27 ON 28 AUG 2002)

FILE 'BIOSIS' ENTERED AT 14:54:15 ON 28 AUG 2002

L1 191 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR PREOSTEOCLAST
L2 93185 S PERIPHERAL BLOOD
L3 14 S L1 AND L2
L4 486 S JOINT FLUID
L5 0 S L1 AND L4
L6 79963 S JOINT
L7 4 S L6 AND L1
L8 6224 S OSTEOCLAST
L9 3 S L8 AND L4
L10 14042 S PHYTOHEMAGGLUTININ
L11 4515 S L2 AND L10
L12 27 S HUMNA
L13 5239770 S HUMAN
L14 3470 S L11 AND L13
L15 12336 S HUMAN PERIPHERAL BLOOD
L16 1135 S L15 AND L10
L17 27630 S SUPERNATANT OR CULTURE FILTRATE
L18 49 S L17 AND L16
L19 0 S L18 AND L1
L20 0 S L18 AND L8
L21 274644 S DIFFERENTIAT?
L22 4 S L21 AND L18
L23 585 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL BLOOD)
L24 22 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL BLOOD) (P)
L25 118 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL BLOOD) (P)
L26 9 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)MITOGEN STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL B
L27 0 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)MITOGEN STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL B
L28 0 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)MITOGEN STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL B
L29 1 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)MITOGEN STIMULAT?(P) (HUMAN PERIPHERAL B
L30 16 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)STIMULATED(P) (HUMAN PERIPHERAL BLOOD) (P
L31 49 S L17 AND L15 AND L10
L32 134983 S CYTOKINE OR IL
L33 10 S L31 AND L32
L34 443 S PHYTOHEMAGGLUTININ (P)STIMULATED(P) (HUMAN PERIPHERAL BLOOD)
L35 0 S L34 AND L1
L36 2 S L34 AND L8
L37 575 S MITOGEN (P)STIMULATED(P) (HUMAN PERIPHERAL BLOOD)
L38 0 S L37 AND L1
L39 0 S L37 AND L8
L40 812 S EOTAXIN
L41 0 S L40 AND L1
L42 1 S L40 AND L8
L43 319 S OSTEOCLAST PRECURSORS
L44 153 S OSTEOCLAST PRECURSOR
L45 153 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS
L46 414 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS
L47 0 S L46 AND L23
L48 0 S L37 AND L46
L49 0 S L4 AND L46
L50 9 S L6 AND L46

FILE 'MEDLINE' ENTERED AT 16:11:22 ON 28 AUG 2002

L51 449 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS OR PREOSTEOCLAS
L52 733 S (MITOGEN OR PHYTOHEMAGGLUTININ) (P)STIMULATED(P) (HUMAN PERIPHE
L53 0 S L52 AND L51
L54 7954 S OSTEOCLASTS OR OSTEOCLAST
L55 2 S L54 AND L52

FILE 'BIOSIS' ENTERED AT 16:14:15 ON 28 AUG 2002

L56 491 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS OR PREOSTEOCLAS

L57 1 S L56 AND L40
L58 7404 S IL3 OR IL 3
L59 8 S L58 AND L56
L60 1788 S IL7 OR IL 7
L61 0 S L56 AND L60
L62 8609 S OSTEOCLASTS OR OSTEOCLAST
L63 6 S L62 AND L60

FILE 'MEDLINE' ENTERED AT 16:34:33 ON 28 AUG 2002

L64 1491 S IL7 OR IL 7
L65 449 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS OR PREOSTEOCLAS
L66 1 S L65 AND L64

FILE 'EMBASE' ENTERED AT 16:36:22 ON 28 AUG 2002

L67 404 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS OR PREOSTEOCLAS
L68 1364 S IL7 OR IL 7
L69 1 S L67 AND L68

FILE 'SCISEARCH' ENTERED AT 16:36:53 ON 28 AUG 2002

L70 482 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS OR PREOSTEOCLAS
L71 1604 S IL7 OR IL 7
L72 1 S L70 AND L71

FILE 'CAPLUS' ENTERED AT 16:37:17 ON 28 AUG 2002

L73 394 S OSTEOCLAST PRECURSOR OR OSTEOCLAST PRECURSORS OR PREOSTEOCLAS
L74 1468 S IL7 OR IL 7
L75 1 S L73 AND L74
L76 5555 S IL3 OR IL 3
L77 6 S L76 AND L73
L78 821 S (MITOGEN OR PHYTOHEMAGGLUTININ) (P) STIMULATED (P) (HUMAN PERIPHE
L79 0 S L78 AND L73
L80 5788 S OSTEOCLAST OR OSTEOCLASTS
L81 3 S L80 AND L78
L82 139 S OSTEOCLAST PROGENITORS OR OSTEOCLAST PROGENITOR
L83 0 S L82 AND L78
L84 47525 S PERIPHERAL BLOOD
L85 4 S L84 AND L82
L86 214 S JOINT FLUID
L87 0 S L86 AND L82
L88 56440 S JOINT
L89 3 S L88 AND L82

FILE 'BIOSIS' ENTERED AT 16:51:32 ON 28 AUG 2002

L90 160 S OSTEOCLAST PROGENITORS OR OSTEOCLAST PROGENITOR
L91 8 S L2 AND L90
L92 0 S L4 AND L90
L93 3 S L6 AND L90
L94 5 S L90 AND L58
L95 0 S L90 AND L60
L96 0 S L40 AND L90

=> s 137 and 190

L97 0 L37 AND L90

=> s 123 and 190

L98 0 L23 AND L90

=>



(LS 11308)

特集 食細胞のニューコンセプト—生体制御における機能発現と役割

破骨細胞の分化とマクロファージ

宇田川信之* 高橋 直之* 赤津 拓彦* 須田 立雄*

Osteoclast differentiation and macrophages

Nobuyuki Udagawa, Naoyuki Takahashi, Takuhiko Akatsu, Tatsuo Suda

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Showa University

Osteoclasts are multinucleated cells that mediate bone resorption. They are positive in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and calcitonin receptors. Its progenitors are believed to originate from hemopoietic stem cells. However, the precise nature of osteoclast progenitors and the mechanism of their differentiation into osteoclasts are still controversial. We previously reported that osteoclast-like cells were formed in co-cultures of mouse bone marrow-derived stromal cells (ST2) and spleen cells in the presence of $1\alpha, 25$ -dihydroxy-vitamin D_3 and dexamethasone. When relatively small number of mononuclear cells (10^3 - 10^5 cells per well) obtained from either mouse bone marrow, spleen, thymus, or peripheral blood were cultured on the ST2 cell layers, they formed colonies containing TRAP-positive mononuclear and multinucleated cells (TRAP-positive colonies) in response to the two hormones with a linear relationship between the number of colonies formed and the number of hemopoietic cells inoculated. All of the colonies consisted of non-specific esterase-positive cells. The monocyte-depleted population prepared from peripheral blood failed to form colonies; whereas the monocyte-enriched population produced a large number of TRAP-positive colonies. In addition, alveolar macrophages formed TRAP-positive colonies most efficiently on the ST2 cell layers in response to the two hormones. Salmon [125 I]-labeled calcitonin specifically bound to the TRAP-positive cells. Resorption lacunae were formed on dentine slices on which co-cultures were performed. When direct contact between the peripheral blood cells and the ST2 cells was inhibited by a collagen-gel sheet, no TRAP-positive cells were formed. These results indicate that osteoclasts are derived from not only immature hemopoietic cells but also mature monocytes and macrophages, when a suitable microenvironment is provided by bone marrow-derived stromal cells.

I. 骨は生きている

骨組織は常に骨形成と骨吸収を繰り返すことにより、その正常な機能が維持されている。こ

の現象を骨の改造 (bone remodeling) と呼ぶが、それを司るのが骨芽細胞と破骨細胞である。未分化の間葉系細胞より分化する骨芽細胞 (osteoblast) は骨基質を分泌し、石灰化を促した後、自らは石灰化した骨基質に埋め込まれて骨細胞 (osteocyte) となる。一方、破骨細胞 (osteoclast)

*N. Udagawa, N. Takahashi, T. Akatsu, T. Suda : 昭和大学歯学部生化学教室

は造血幹細胞に由来し、数個から数十個の核を有する形態的にも機能的にもユニークな多核細胞である。骨はこれらの細胞によって連鎖的に改造現象が営まれている。

最近、われわれは *in vitro* において、骨吸収因子（活性型ビタミンD、副甲状腺ホルモン、 PGE_2 など）の刺激により骨髓細胞あるいは脾細胞から破骨細胞様多核細胞を形成させることに成功した。また、その過程で破骨細胞の形成には骨芽細胞あるいは骨髓由来のストローマ細胞が重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、骨髓由来のストローマ細胞が存在すれば、未熟な造血細胞からだけでなく単球やマクロファージからも破骨細胞が分化できる可能性をつきとめた。本稿では、骨組織にのみ存在する破骨細胞の分化のしくみについて、最近のわれわれの実験結果を中心に概説したい。

II. 造血細胞に対するビタミンDの分化誘導作用

ビタミンDの活性型代謝産物である $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ [$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$] は、小腸と骨を標的器官とする生体内のカルシウムの恒常性を制御するホルモン（カルシウム調節ホルモン）である¹⁾。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、カルシウム調節ホルモンとしての作用に加えて、近年、造血細胞や表皮細胞などの増殖や分化に深く関与することが明らかになった。その契機となっ

たのは、阿部ら(昭和大)によって明らかにされた、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がマウスの骨髓性白血病細胞(M1)をマクロファージ系の細胞へ分化誘導させる強力な作用をもつという発見であった²⁾(1981年)。その後、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はヒトの白血病細胞(HL-60, U937, THP-1)ばかりでなく、正常の骨髓細胞もマクロファージに分化させることが報告された。マクロファージは、その最終分化として多核巨細胞を形成するが、1983年には、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は未熟な骨髓細胞をマクロファージに分化させるだけでなく、ある種のマクロファージを融合させて多核巨細胞を形成させる作用があることも明らかとなった³⁾(図1)。すなわち、肺胞マクロファージの単独培養系に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加すると、2～3日間という短期間に高率(80%)に融合が起こる。肺胞マクロファージに対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の融合促進作用はポリアミン、特にスペルミジン合成を介して起こり、スペルミジンに依存してトランスグルタミナーゼが誘導され、マクロファージの融合が促進することが明らかとなった^{4,5)}。しかしながら、マクロファージの融合により形成される多核巨細胞は、後述するように骨を吸収する能力がなく、骨組織にのみ存在する多核巨細胞(破骨細胞)とは明らかに性格を異にする細胞である。そこでわれわれは、破骨細胞としての形質を備える多核細胞を *in vitro* で形成させる実験系の確立を試みた。

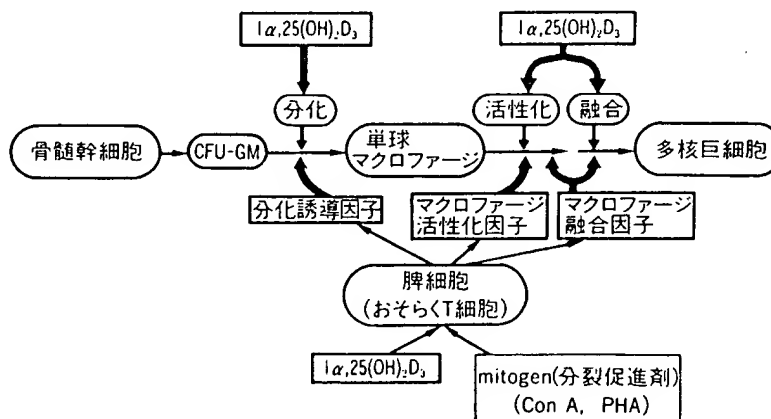


図1 骨髓細胞の分化と融合に及ぼす $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の直接作用と脾細胞を介した間接作用

Ⅲ. 破骨細胞形成のための培養系の確立：破骨細胞形成には骨芽細胞様ストローマ細胞が関与する

マクロファージと破骨細胞は類似した細胞である反面、種々の相違点がある。すなわち、マクロファージは非特異性エステラーゼ (non-specific esterase : NSE) 陽性の細胞で、Fc, C3bi レセプターおよび $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のレセ

プターを有するが、これらの形質は破骨細胞には認められない⁶⁾。一方、破骨細胞は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) 陽性の多核細胞で⁶⁾、きわめて多数のカルシトニンレセプターを持ち、カルシトニンに反応して細胞収縮を起こす⁷⁾。破骨細胞の最も重要な特徴は、骨表面と接した部分に波状縁 (ruffled border) と呼ばれる微絨毛と明帯 (clear zone) を形成することにより、

表1 破骨細胞とマクロファージの比較

	破骨細胞	マクロファージ
酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP)	+	-
カルシトニンレセプター (CTR)	+	-
骨吸収窩の形成	+	-
非特異性エステラーゼ (NSE)	-	+
Fc, C3bi レセプター	-	+
プロトンポンプ (Vacuolar type)	+	++
炭酸脱水素酵素 II (CA II)	+	++
ビトロネクチンレセプター (VNR)	+	++

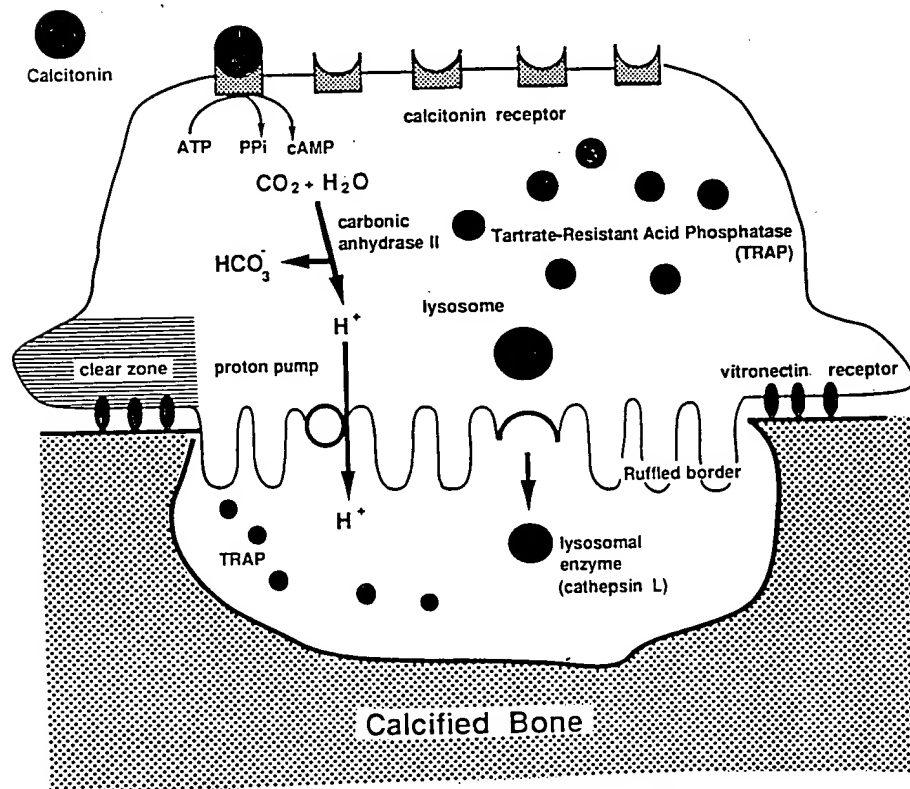


図2 破骨細胞による骨吸収のメカニズム

高度に石灰化した骨組織を高率良く破壊吸収することである⁶⁾(表1, 図2)。

1980年代になり、破骨細胞の形成誘導を調べる実験系として、ネコ⁸⁾、ヒト⁹⁾およびヒト¹⁰⁾の骨髄細胞の長期培養系(3週間)が開発された。われわれは、マウスの骨髄細胞を用いて、より短期間(6~8日間)で、再現性良く破骨細胞に類似した多核細胞を形成させる培養系の確立に成功した¹¹⁻¹³⁾。1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の存在下でマウスの骨髄細胞から作られた多核細胞は、TRAP陽性であること¹¹⁾、カルシトニン受容体を有すること¹⁴⁾、ruffled border と clear zone を形成して石灰化組織を吸収すること¹⁵⁾等、本来の破骨細胞が有する重要な形質をすべて有することが明らかとなった。ところで、骨髄細胞中にはCFU-F(線維芽細胞コロニー形成細胞)と呼ばれる骨芽細胞様ストローマ細胞の前駆細胞が存在する。マウスの骨髄細胞を6~8日培養後、骨芽細胞のマーカー酵素であるアルカリホスファターゼ(ALP)とTRAPの二重染色を施すと、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の存在下で形成された TRAP陽性の単核細胞ならびに多核細胞は、ALP陽性の骨芽細胞様細胞のコロニーに近接した部位にのみ形成されることが明らかになった¹¹⁾。また、TRAP陽性多核細胞の前駆細胞と考えられる TRAP陽性単核細胞は、ALP陽性の骨芽細胞コロニーと同時に出現した。つまり、破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞様ストローマ細胞のコントロールの下で増殖・分化するのではないかと考えられた。

そこで、破骨細胞の形成における骨芽細胞の役割を明らかにするため、骨芽細胞(コラゲナーゼ処理により新生仔マウス頭蓋冠から得た初代骨芽細胞様細胞分画)と破骨細胞の前駆細胞を含む脾細胞の共存培養系を試みた¹⁶⁾。骨芽細胞あるいは脾細胞を単独で培養した場合は、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の有無にかかわらず、TRAP陽性多核細胞の形成を認めなかったが、両者の共存培養において、破骨細胞様の多核細胞は、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ に依存して多数形成された¹⁶⁾(図3)。しかし、この共存培養において骨芽細胞と脾細胞の接触を阻止すると、TRAP陽性細胞の形成

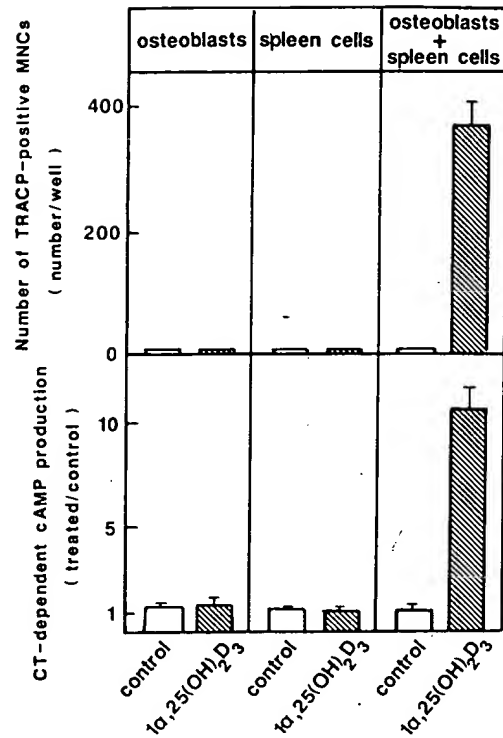


図3 マウスの骨芽細胞と脾細胞の単独あるいは共存培養系における TRAP陽性多核細胞(MNC)の形成(上段)と、カルシトニン(CT)依存性の cAMP 産生(下段)に及ぼす 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ (10 $^{-8}$ M) の効果

は全く認められなかった¹⁶⁾。また、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ で処理した骨芽細胞の培養上清を脾細胞の培養系に添加しても、TRAP陽性細胞は形成されなかった。以上の知見より、骨形成にのみ関与すると考えられていた骨芽細胞が、破骨細胞の形成をコントロールするという意外な機能も有していることが明らかになった。さらに、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の接触、あるいは両細胞により作られる微細環境が破骨細胞の分化に重要であることが示唆された。

IV. 株化ストローマ細胞の破骨細胞形成支持能

われわれは、破骨細胞形成に関与するストローマ細胞の性質を詳しく検索するため、数種の株化ストローマ細胞と脾細胞との共存培養を行った¹⁷⁾。その結果、造血細胞の増殖支持活性を

有する骨髓由来の株化ストローマ細胞[MC3T3-G2/PA6 (PA6), ST2]が、共存培養での破骨細胞形成に対する初代骨芽細胞画分の代用になることが明らかになった¹⁷⁾。PA6あるいはST2細胞を用いた場合は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により誘導される TRAP 陽性多核細胞の出現を dexamethasone が著しく促進した(表2)。また、乳癌組織由来の前脂肪細胞である ST13細胞と骨芽細胞の形質を有する MC3T3-E1(E1)細胞は、破骨細胞形成を支持することはできなかった¹⁷⁾。しかしながら、E1細胞が初代骨芽細胞画分の代用にならなかったといっても、骨芽細胞に破骨細胞形成支持能がないと結論することはできない。それは、株化された E1細胞が骨芽細胞としての形質をすべて備えているとは考えられないからである。そこで、マウス頭蓋骨をコラゲナーゼで処理して得た骨芽細胞画分より破骨細胞形成支持能を指標として新しい骨芽細胞(ストローマ細胞)株の樹立を試みた¹⁸⁾。得られたマウス頭蓋骨由来の株化ストローマ細胞(KS-4)は、脾細胞との共存培養において、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ あるいは副甲状腺ホルモン(PTH)の存在下で TRAP 陽性多核細胞の誘導を著しく

促進した¹⁸⁾。この時、dexamethasone は必要でなかった。また、KS-4細胞は、PTH レセプターを有し、*in vitro*において骨組織を形成するという骨芽細胞の重要な形質を満たしていた(表2)¹⁸⁾。以上の知見より、KS-4細胞は骨芽細胞としての形質と破骨細胞形成支持能を兼ね備えていることが示され、破骨細胞形成における骨芽細胞の重要性が再認識された。

V. 破骨細胞形成に必要な微細環境

血液学における血球の分化機構の研究は、破骨細胞の分化を探るためにも大変参考になる。骨髓中には形態的にも機能的にも多種類の細胞が存在するが、これらはいずれも CFU-S を唯一の造血幹細胞として増殖・分化した細胞である。それらの分化と増殖の過程には種々の造血因子(colony stimulating factor, CSF)が作用し、サイトカインネットワークが構成されている。一方、骨髓細胞の長期培養(Dexter culture)の確立により、*in vitro*で長期間 CFU-S を維持することが可能となり、造血微細環境の解析が可能となった¹⁹⁾。Dexter culture では、血球前駆細胞の増殖と分化に粘着性の骨髓由来のス

表2 マウスの初代骨芽細胞集団と各種株化ストローマ細胞の破骨細胞形成支持能と骨芽細胞としての形質の比較

形 質	マウス初代骨芽細胞あるいは樹立ストローマ細胞				
	PA6	ST2	KS-4	MC3T3-E1	Primary osteoblastic cells
起源	骨髓 ^{a)}	骨髓	頭蓋骨	頭蓋骨	頭蓋骨
アルカリホスファターゼ ^{b)}	+	+	+++	+++	+++
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ レセプター	+	+	+	+	+
PGE ₂ レセプター	+	+	+	+	+
PTHレセプター	-	-	+	+	+
石灰化した nodule の形成	-	-	+	+	+
処 理	破骨細胞形成支持能 ^{c)}				
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	+	+	++++	-	++++
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +dexamethasone	++	++	++++	-	++++
PGE ₂	+	+	++	-	++
PTH	-	-	++	-	++

a) マウス頭蓋骨より樹立された株細胞であるが、骨髓由来ストローマ細胞の形質を有する。

b) アルカリホスファターゼは、その活性の強さ(+~++++)で評価した。

c) 破骨細胞形成支持能は、脾細胞との共存培養系で評価した(-~++++)。

ストローマ細胞の増殖が必須である²⁰⁾。一方、脾臓や肝臓由来のストローマ細胞には、造血を支持する能力がない。破骨細胞形成支持能を有するPA6細胞は、グルココルチコイドに応答して脂肪細胞に分化する骨髓型の前脂肪細胞であり、骨髓細胞との共存培養において、造血幹細胞を維持する能力を有している²¹⁾。また、造血幹細胞が増殖するためには、PA6細胞との直接接触 (direct contact) が必要である²²⁾。

PA6細胞は IL-3 や GM-CSF を産生しないため、PA6細胞の増殖支持活性は、既知の造血因子によるものではないことが示唆されていた²³⁾。このように、骨髓由来のストローマ細胞が産生する造血促進因子は、細胞膜にアンカーされて発現するものと予想されていたが、最近、その本体が複数の研究室によってほぼ同時に明らかにされた²⁴⁾。この造血促進因子は SLF (steel factor) と呼ばれ、1 個の膜貫通ドメインを有する 248 個のアミノ酸残基よりなる糖蛋白で、造血支持能を有するストローマ細胞の細胞膜に発現していることが示された²⁴⁾。PA6細胞の造血支持機構にも SLF は密接に関与すると考えられるが、その詳細は今後の研究に待たたい。

前述のように、破骨細胞形成においても、ストローマ細胞と破骨細胞前駆細胞との直接接触が必要であった。このことは、両細胞の cell-to-cell interaction,あるいはストローマ細胞が産生する matrix と破骨細胞前駆細胞との cell-to-matrix interaction の重要性を意味しており、破骨細胞の分化の研究ではこの本体を解明することが現在最も大きな課題となっている。

前述の SLF は果たして破骨細胞の分化に関与するのであろうか。遺伝的に貧血を起こすマウスに、 W/W^o と Sl/Sl^d という 2 種類の遺伝子型のマウスが存在する²⁵⁾。従来、前者は造血幹細胞 (Seed) に、後者はストローマ細胞 (Farm) に欠陥があると考えられてきた。最近の研究により、 W 遺伝子産物は $c-kit$ proto-oncogene であり、 Sl 遺伝子の産物は SLF ($c-kit$ 遺伝子のリガンド) であることが明らかにされた^{24,25)}。熊本大学の西川らは、 $c-kit$ の機能を阻害する

モノクローナル抗体を作成し、成熟マウスに投与したところ、骨髓中の 9 割以上の細胞が B 系細胞で占められるようになり、恒常的な造血はほぼ完全に抑制されてしまった²⁶⁾。つまり、造血幹細胞由来と考えられる破骨細胞²⁷⁾は、 $c-kit$ に依存して増殖する可能性が示されたのである。しかしながら、 $c-kit$ 欠損動物の W/W^o マウスや SLF 欠損動物である Sl/Sl^d マウスの骨には異常が認められない。われわれも、 W/W^o マウス由来の骨髓細胞や脾細胞が、ST2細胞との共存培養系で破骨細胞に分化できることを確認している。また、後述するように、破骨細胞はかなり分化の進んだマクロファージ系の細胞からも分化が可能であることを考えると、破骨細胞の最終分化に関与するストローマ細胞由来の因子は SLF 以外の因子であろうと想像される。われわれは、これまでの予備的な検討から、この分子は液性因子ではなく、骨吸収因子の刺激の下で骨芽細胞が産生する非分泌型の因子であると考えている。

VI. 破骨細胞の起源：単球・マクロファージからの破骨細胞形成

造血幹細胞から破骨細胞への分化の過程については、これまで種々の仮説が提案され、様々な実験結果が報告されてきた。その歴史的な研究の流れについては他の総説^{28,29)}を参照されたい。破骨細胞の分化の過程には、現在 3 つの考え方がある。その第 1 の可能性は、破骨細胞は単球・マクロファージとは異なる系統の血液細胞に由来するというものであり、第 2 の可能性は、単球・マクロファージと破骨細胞は共通の前駆細胞に由来するというもの、そして第 3 の考え方は、成熟分化した単球・マクロファージからも破骨細胞は形成されるというものである。

われわれは、破骨細胞の起源を明らかにする目的で、破骨細胞の前駆細胞が存在すると考えられる各種組織の細胞と破骨細胞形成支持能を有する ST2細胞との共存培養を行った³⁰⁾。ST2細胞が単層の feeder layer を形成した後、24 穴培養プレートに少数 (10^4 個) の脾細胞を植え込んで、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と dexamethasone の存

在下で共存培養した。共存培養5日目頃より、ST2細胞上に脾細胞由来の細胞集塊とそれが成長して大きくなったコロニーが形成された。10日目頃より形成されたコロニーの約30%に、コロニーの中心部に TRAP 陽性の単核細胞の出現が認められるようになった。その後、コロニー形成細胞の増殖に伴って、TRAP 陽性細胞は融合し多核となり、それらはコロニー周辺部に移動していった。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と dexamethasone 非存在下でも、コロニー形成は同様に認められたが、TRAP 陽性細胞は全く出現しなかった³⁰⁾。

次に、このコロニー形成法を用い、各種造血組織（脾臓・骨髓・胸腺細胞および末梢血単核細胞）に由来する細胞の TRAP 陽性細胞への分化能を検討した³⁰⁾。その結果、骨髓細胞や脾細胞のみならず、末梢血の単核細胞からも TRAP 陽性細胞を含む多数のコロニーが形成されることが明らかになった。形成された TRAP 陽性

細胞を含むコロニー数と共存培養に供した単核細胞数との間には、原点を通る直線関係が描かれ、両者の間にはきわめて高い相関関係が認められた（図4）。次に、末梢血単核細胞を分画し、どのような細胞が TRAP 陽性細胞を含むコロニーを形成するのかを検討した。末梢血単核細胞から単球を除去すると ST2細胞上にはコロニーが現われなかった（図4D）。一方、高密度に単球を含む画分には高い TRAP 陽性コロニー形成能が認められた（図4D）。共存培養したこれらの細胞に TRAP と NSE の二重染色を施し、コロニー形成細胞の性質を検討したところ、ST2細胞上で形成されたすべてのコロニーは NSE 陽性のマクロファージコロニーよりなり、その中に TRAP 陽性細胞が多数認められた³⁰⁾。以上の知見より、NSE 陽性マクロファージと TRAP 陽性破骨細胞は同一の細胞より分化することが強く示唆された。

次に、成熟したマクロファージからも破骨細

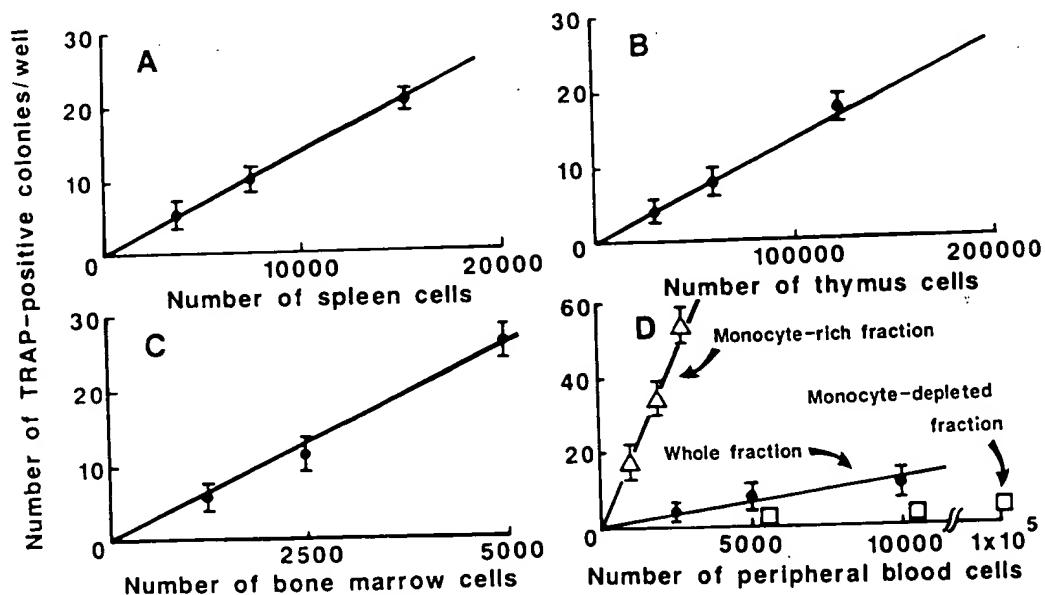


図4 各種の造血組織に由来する単核細胞を ST2 の cell layer 上で共存培養したときの、播種した単核細胞数と形成された TRAP 陽性細胞を含むコロニー数との相関

マウスの脾細胞(A)、胸腺細胞(B)、骨髓細胞(C)、および末梢血単核細胞(D)を ST2 の cell layer 上に播種し、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と dexamethasone の存在下で共存培養した。末梢血単核細胞は、さらに単球を除いた画分と、単球を enrich した画分に分画した(D)。いずれも12日間の共存培養後、TRAP染色を施し、TRAP陽性細胞を含むコロニー数を計測した。

胞が形成されるか否か調べるため、ST2細胞の feeder layer 上で $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の存在下でマウスの肺胞マクロファージを培養した³⁰⁾。倍数希釈して得られた非常に少ない細胞数の肺胞マクロファージは、ST2細胞上できわめて効率よくコロニーを形成し、そのほとんどすべてのコロニー中に TRAP 陽性細胞が出現した。チオグリコレートで刺激して得られたマウスの腹腔マクロファージを用いた場合も同様の結果が得られた。肺胞マクロファージ由来の TRAP 陽性細胞にはカルシトニンレセプターの存在が認められた。また、象牙質や骨切片上で、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と dexamethasone の存在下で ST2 と肺胞マクロファージの共存培養を行い、走査電顕によりその切片表面を観察したところ、多数の吸収窩の形成が認められた。肺胞マクロファージ単独培養系においては、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により融合が促された多核細胞には、カルシトニンレセプターは存在せず、骨吸収能も認められなかった³⁰⁾。以上の実験結果は、骨髓由来のストローマ細胞が存在すれば、未熟な造血細胞のみならず、分化した単球・マクロファージからも破骨細胞は形成されることを示している(図5)。

VII. 破骨細胞形成におけるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の役割

ST2細胞上でのマクロファージコロニーの形成に關与する因子は何であろうか。ST2細胞は IL-3 や GM-CSF を産生しないが M-CSF を産生する³¹⁾。M-CSF は肺胞マクロファージの増殖に作用することが報告されている³²⁾。われわれも、M-CSF の存在下でメチルセルロース中で形成された骨髓細胞由来のコロニーに、将来破骨細胞に分化する前駆細胞が最も多く含まれているという実験結果を得ており、M-CSF が破骨細胞前駆細胞の最も強力な増殖因子であると考えている(図5)。ところで、M-CSF は膜貫通ドメインを有するため、膜結合型の M-CSF の存在が想定されている。最近、膜結合型 M-CSF 前駆体をコードする cDNA を transfect したストローマ細胞上で、効果的に造血細胞由来のマクロファージコロニーが形成されることが報告された³³⁾。ST2細胞上でわれわれが観察したマクロファージコロニーとの関連が注目される。

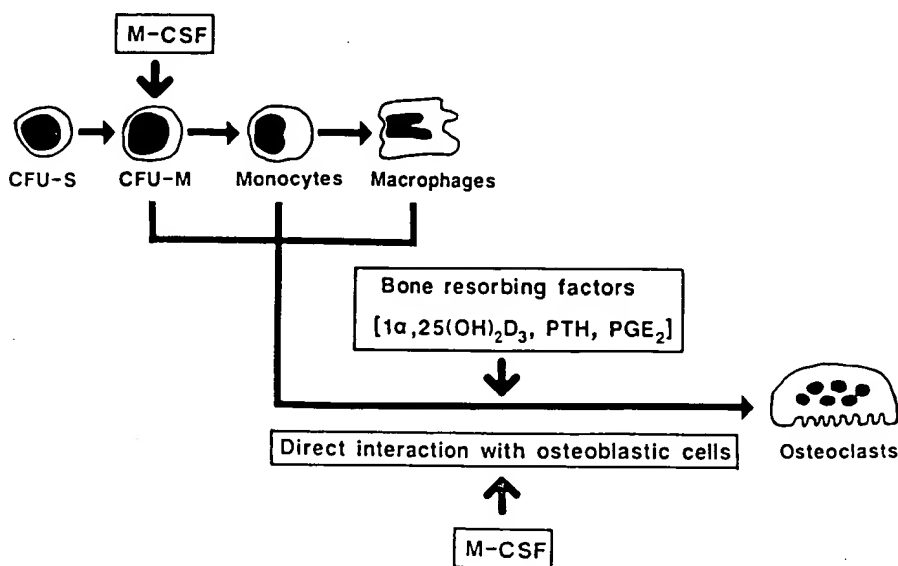


図5 破骨細胞の分化モデル

破骨細胞が欠損して骨の改造不全を呈する大理石骨病 (osteopetrosis) の一部は、骨髄移植により治癒することから、このタイプの大理石骨病は破骨細胞の前駆細胞に異常があると考えられている³⁴⁾。一方、骨髄移植によっては治癒しないタイプの大理石骨病も存在し、このタイプの大理石骨病は造血支持環境の異常に起因すると考えられている³⁴⁾。後者のタイプの遺伝性大理石骨病のモデルに *op/op* マウスがある。以前より *op/op* マウスから得られたストローマ細胞にはマクロファージの増殖を支持する活性が欠如していることが知られていたが³⁵⁾、その詳細は不明であった。1990年、熊本大学の吉田らは、*op/op* マウスの M-CSF の構造遺伝子に余分な thymidine 1 個の挿入を見出し、そのため *op/op* マウスでは生理活性を有する M-CSF が産生されないことを報告した³⁶⁾(図 6)。

われわれは、*op/+* の heterozygote の親マウスより生まれた *op/op* (大理石骨病マウス) と *+/?* (正常マウス) から骨芽細胞と脾細胞を調製し、前述の共存培養法を用いて破骨細胞の形成を検討した³⁷⁾。*op/op* マウスの脾細胞と正常 *ddy* マウス由来の骨芽細胞を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の存在下で共存培養すると、*+/?* マウスの脾細胞を用いた場合と同様に、TRAP陽性でカルシトニンレセプターを有する破骨細胞様細胞が多数形成された。このことから、*op/op* マウスの破骨細胞前駆細胞には異常がないことが明らかとなった。一方、*op/op* マウス由来の骨芽細胞と

ddy マウスの脾細胞との共存培養においては、TRAP陽性の単核および多核細胞は全く出現せず、*op/op* マウス由来の骨芽細胞が破骨細胞形成支持能を欠如していることが明らかとなった。破骨細胞の形成が認められないこの *op/op* マウスの骨芽細胞と *ddy* マウスの脾細胞の共存培養系に $20\sim 200\text{ng/ml}$ の M-CSF を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とともに添加したところ、濃度依存的に TRAP陽性の破骨細胞様細胞が形成された³⁷⁾(表 3)。また、*op/op* マウスの骨芽細胞は M-CSF を産生しないことも明らかにされた^{38,39)}。ベルン大学(スイス)の Felix ら、および奥羽大学の小玉らは、*op/op* マウスに M-CSF を連日投与することにより、大理石骨病の症状が改善され、骨組織には破骨細胞が出現するようになることを報告した⁴⁰⁻⁴¹⁾。以上の知見より、*op/op* マウスにおける破骨細胞数の減少は、骨芽細胞の M-CSF 産生異常に起因すると考えられる。このことから、破骨細胞形成におけるストローマ細胞の役割の一つは M-CSF を産生することであると思われる(図 5)。

VIII. 破骨細胞とマクロファージ

マクロファージは生体のあらゆる組織に広く存在している。しかし、それらは肺泡マクロファージ、腹腔マクロファージ、Kupffer 細胞(肝臓)、microglia(脳)などと呼ばれるように、それぞれの組織によりマクロファージの形態と機能を異にする。これらのマクロファージの分化

		85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	
M-CSF		Ala	Phe	Phe	Leu	Val	Gln	Asp	Ile	Ile	Asp	Glu	***
Gene		GCC	TTT	TTT	CTG	GTA	CAA	GAC	ATA	ATA	GAT	GAG	***
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> <i>op/op</i> mutation [T(Thymidine) insertion at 262 bp] </div>													
					↓								
<i>op/op</i>	M-CSF	GCC	TTT	TTT	T CT	GGT	ACA	AGA	CAT	AAT	AGA	TGA	***
	Gene	Ala	Phe	Phe	Ser	Gly	Asn	Arg	His	Asn	Arg	*	
		85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	

図 6 *op/op* マウスに見出される M-CSF 遺伝子の異常 (Yoshida, H. et al. : Nature, 345 : 442, 1990³⁶⁾)

表3 *op/op*マウスの脾細胞と骨芽細胞を用いた共存培養系における破骨細胞形成と骨髄移植による *in vivo* での破骨細胞の形成

共存培養系に用いた細胞の由来		<i>in vitro</i> における 破骨細胞の形成	骨髄移植による <i>in vivo</i> での 破骨細胞形成
脾細胞 (donor)	骨芽細胞 (recipient)		
正常 ^{a)} マウス	正常マウス	+	+
<i>op/op</i> マウス	正常マウス	+	(+) ^{b)}
正常マウス	<i>op/op</i> マウス	-	-
正常マウス	<i>op/op</i> マウス (+M-CSF)	+	(+) ^{b,c)}

a) ddy マウスを正常マウスとして用いた。

b) 実際のデータはないが、予想される結果。

c) *op/op*マウスに M-CSF を投与すると骨組織に破骨細胞が認められる。

過程のモデルとして、mononuclear phagocyte system (MPS: 単核食細胞系) という概念が知られている⁴²⁾。この考えによると、マクロファージは骨髄中の造血幹細胞に由来し、CFU-GM⇒CFU-Mを経てさらに単球となって血流に入り、種々の組織に分布してマクロファージになると考えられる。破骨細胞の分化もこの概念にあてはめて考えることが可能であろう。すなわち、CFU-M由来の破骨細胞前駆細胞は、骨組織という微細環境において、骨のみに存在するマクロファージである破骨細胞に分化するのである(図5)。

単球・マクロファージは、ST2細胞上で増殖してコロニーを形成する³⁰⁾。破骨細胞はこのマクロファージコロニー中より出現した。しかし、ST2細胞上で形成されたマクロファージコロニーを採取して、造血因子の存在下でメチルセルロース中で培養してもコロニー形成は全く認められなかった。この結果から、単球・マクロファージがST2細胞上で増殖することにより未分化な細胞に脱分化し(祖先返り)、破骨細胞に分化するという可能性は否定される。しかし、破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化する時、果たして前駆細胞のストローマ細胞上での増殖が必須であるかどうかは未解決であり、今後の検討が必要である。また、破骨細胞に分化するとマクロファージの形質が消失するが、それらの形質はどの段階で消失するかという問題も今後の課題である。破骨細胞は、TRAP活性、カルシ

トニンレセプターおよび骨吸収能といった他のマクロファージにはない特異な形質を有している。このことは、マクロファージの発生・増殖・分化の過程を追跡するためにも有用であると考えられる。

おわりに

この数年の研究により、破骨細胞は単球・マクロファージ系の造血細胞に由来すること、その分化過程は骨芽細胞(骨髄由来のストローマ細胞)が鍵を握っていることが明らかにされた。骨芽細胞が産生するM-CSFは破骨細胞前駆細胞の増殖に欠くべからざる因子である。1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ などの骨吸収因子は、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞により形成される微細環境の構築に作用する(図5)。その分子レベルでの解析はこれからの大きな課題である。

文 献

- 1) Suda, T. et al. : The role of vitamin D in bone and intestinal cell differentiation. Annu. Rev. Nutr., **10** : 195-211, 1990
- 2) Abe, E. et al. : Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** : 4990-4994, 1981
- 3) Abe, E. et al. : 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ promotes fusion of mouse alveolar macrophages both by a direct mechanism and by a spleen cell-mediated indirect

- mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** : 5583-5587, 1983
- 4) Hayashi, T. et al. : Polyamines are involved in the $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 -induced fusion of mouse alveolar macrophages. J. Bone Miner. Res., **1** : 235-242, 1986
- 5) Tanaka, H. et al. : Spermidine-dependent proteins are involved in the fusion of mouse alveolar macrophages induced by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 and interleukin 4. Exp. Cell Res., **180** : 72-83, 1989
- 6) Mundy, G. A. & Roodman G. D. : Osteoclast ontogeny and function. In : Peck W. A. (ed.), Bone and Mineral Research. Elsevier, Amsterdam, vol 5 : 209-279, 1987
- 7) Nicholson, G. C. et al. : Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. J. Clin. Invest., **78** : 355-360, 1986
- 8) Ibbotson, K. J. et al. : Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. J. Cell Biol., **99** : 471-480, 1984
- 9) Roodman, G. D. et al. : $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82** : 8213-8217, 1985
- 10) MacDonald B. R. et al. : Formation of multinucleated cells which respond to osteotropic hormones in long-term human marrow cultures. Endocrinology, **120** : 2326-2333, 1987
- 11) Takahashi, N. et al. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology, **122** : 1373-1382, 1988
- 12) Akatsu, T. et al. : Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenocine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. J. Bone Miner. Res., **4** : 29-35, 1989
- 13) Akatsu, T. et al. : Parathyroid hormone (PTH)-related protein is a potent stimulator of osteoclast-like multinucleated cell formation to the same extent as PTH in mouse marrow cultures. Endocrinology, **125** : 20-27, 1989
- 14) Takahashi, N. et al. : Induction of calcitonin receptors by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. Endocrinology, **123** : 1504-1510, 1988
- 15) Sasaki, T. et al. : Multinucleated cells formed on calcified dentine from mouse bone marrow cells treated with $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 have ruffled borders and resorb dentine. Anat. Rec., **224** : 379-391, 1988
- 16) Takahashi, N. et al. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. Endocrinology, **123** : 2600-2602, 1988
- 17) Udagawa, N. et al. : The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. Endocrinology, **125** : 1805-1813, 1989
- 18) Yamashita, T. et al. : Cloning of an osteoblastic cell line involved in the formation of osteoclast-like cells. J. Cell. Physiol., **145** : 587-595, 1990
- 19) Dexter, T. M. & Lajtha L. G. : Proliferation of hematopoietic cells in vitro. Br. J. Haematol., **28** : 525-530, 1980
- 20) 小玉博明 : 造血幹細胞の長期培養. 代謝, **26** 増刊号「免疫'89」 : 211-217, 1989
- 21) Kodama, H. et al. : A new preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells *in vitro*. J. Cell. Physiol., **112** : 89-95, 1982
- 22) Kodama, H. et al. : *In vitro* hemopoiesis within a microenvironment created by MC3T3-G2/PA6 preadipocytes. J. Cell.

- Physiol., **118** : 233-240, 1984
- 23) Kodama, H. et al. : MC3T3-G2PA6 preadipocytes support *in vitro* proliferation of hemopoietic stem cells through a mechanism different from that of interleukin 3. J. Cell. Physiol., **129** : 20-26, 1986
 - 24) Witte, O.N. : Steel locus defines new multipotent growth factor. Cell, **63** : 5-6, 1990
 - 25) 北村幸彦ほか : 造血支持環境の遺伝子欠陥, 細胞, **22** : 94-97, 1990
 - 26) 西川伸一 : ストローマ細胞と幹細胞の自己再生. 血液・腫瘍科, **21** : 244-249, 1990
 - 27) Kurihara, N. et al. : Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. Blood, **74** : 1295-1302, 1989
 - 28) 羽毛田慈之, 久米川正好 : 骨細胞系の起源をめぐって. 実験医学, **7** : 1286-1292, 1989
 - 29) 田中栄ほか : 破骨細胞—その研究の流れ—. 生体の科学, **42** : 49-56, 1991
 - 30) Udagawa, N. et al. : Origin of osteoclasts : Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87** : 7260-7264, 1990
 - 31) Nishikawa, S. et al. : B lymphopoiesis on stromal cell clone : stromal cell clones acting on different stages of B cell differentiation. Eur. J. Immunol., **18** : 1767-1771, 1988
 - 32) Akagawa, K. S. et al. : Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages. J. Immunol., **141** : 3383-3390, 1988
 - 33) Stein, J. et al. : Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane-bound precursor of human CSF-1. Blood, **76** : 1308-1314, 1990
 - 34) Marks, Jr. S. C. : Osteoclast biology : lessons from mammalian mutation. Am. J. Med. Genet., **34** : 43-54, 1989
 - 35) Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. : Hematological characterization of congenital osteopetrosis in *op/op* mouse. J. Exp. Med., **156** : 1516-1527, 1982
 - 36) Yoshida, H. et al. : The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature, **345** : 442-444, 1990
 - 37) Takahashi, N. et al. : Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells. Endocrinology, in press, 1991
 - 38) Felix, R. et al. : Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic *op/op* mouse. J. Bone Miner. Res., **5** : 781-789, 1990
 - 39) Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. : Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (*op/op*) mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87** : 4828-4832, 1990
 - 40) Felix, R. et al. : Macrophage colony-stimulating factor restores *in vivo* bone resorption in the *op/op* osteopetrotic mouse. Endocrinology, **127** : 2592-2594, 1990
 - 41) Kodama, H. et al. : Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. J. Exp. Med., **173** : 269-272, 1991
 - 42) van Furth, R. : Cells of the mononuclear phagocyte system. In : van Furth R. (ed.), Mononuclear phagocytes. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 1-40, 1980